

Clostridium difficile Toxin A Inhibits Wnt Signaling Pathway in Gut Epithelial Cells

I Na Yoon and Ho Kim*

Division of Life Science and Chemistry, College of Natural Science, Daejin University, Pocheon, Gyeonggido 487-711, Korea

Received June 5, 2018 / Revised July 9, 2018 / Accepted August 28, 2018

Clostridium difficile toxin A causes pseudomembranous colitis. The pathogenesis of toxin A-induced colonic inflammation includes toxin A-dependent epithelial cell apoptosis, resulting in the loss of barrier function provided by epithelial cells against luminal pathogens. Toxin A-dependent epithelial cell apoptosis has been linked to toxin A-induced production of reaction oxygen species and subsequent p38MAPK activation; p21^{CIP1/WAF1} upregulation-dependent cell cycle arrest; cytoskeletal disaggregation; and/or the induction of Fas ligand on epithelial cells. However, the molecular mechanisms underlying toxin A-induced apoptosis remain poorly understood. This study tested whether toxin A could block the Wnt signaling pathway, which is involved in gut epithelial cell proliferation, differentiation and antiapoptotic progression. Toxin A treatment of nontransformed human colonocytes (NCM460) rapidly reduced β -catenin protein, an essential component of the Wnt signaling pathway. Exposure of mouse ileum to toxin A also significantly reduced β -catenin protein levels. MG132 inhibition of proteasome-dependent protein degradation resulted in the recovery of toxin A-mediated reduction of β -catenin, indicating that toxin A may activate intracellular processes, such as GSK3 β , to promote degradation of β -catenin. Immunoblot analysis showed that toxin A increased active phosphorylation of GSK3 β . Because the Wnt signaling pathway is essential for gut epithelial cell proliferation and anti-apoptotic processes, our results suggest that toxin A-mediated inhibition of the Wnt signaling pathway may be required for maximal toxin A-induced apoptosis of gut epithelial cells.

Key words : β -catenin, *Clostridium difficile* toxin A, colitis, epithelial cells, nt signaling

서 론

Clostridium difficile (*C. difficile*) 세균이 분비하는 독신A는 위막성대장염(Pseudomembranous colitis)의 주요 원인물질로 알려져 있다[5, 6, 15, 20]. 독신A는 소화관 점막 상피세포에 반응하여 세포자살을 야기한다[18, 19]. 점막 상피세포의 급격한 세포자살은 장벽기능 감소로 이어져 결국 소화관 내강 속 물질이 체내로 대거 유입되게 하고 이로 인해 급성 장염이 유발되는 것으로 알려져 있다[18, 19]. 독신A에 의한 세포자살 촉진 경로는 활성산소 증가와 p38MAPK의 활성화가 연관되어 있음이 보고되었다[19]. 독신A에 의한 세포골격계 파괴과정 역시 세포자살에 영향을 미친다고 알려져 있다[5, 6, 10-12, 16]. 독신A는 미세섬유와 미세소관 형성을 억제함으로써 세포원형화를 야기하며 이 과정에서 세포자살이 촉진된다고도 보고되었다[10-13]. 반대로 상피세포의 성장 촉진이 세포자살을

감소시켜 장염을 낮춰준다는 연구 결과도 있다[9, 14, 27]. 예를 들어, 곤충 유래 항균펩타이드인 CopA3 경우, 대장상피세포의 성장을 촉진시켜 *C. difficile* 독신A가 야기하는 자살을 억제하며 이를 통해 대장 염증을 유의하게 감소시킨다[17]. EGF에 의한 상피세포 성장 촉진과정이 상피세포 세포자살을 감소시켜 장염을 억제한다고도 알려져 있다[27]. 이상의 결과들은 소화관 상피세포의 자살과정을 적절히 제어하는 것이 독신A가 야기하는 장염을 효과적으로 완화시킬 수 있는 주요 전략이 될 수 있음을 보여준다.

Wnt 신호경로는 발생뿐만 아니라[1] 세포의 성장과 분화[28] 그리고 암세포의 발생[26]에 이르기까지 다양한 세포활성에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다. 특히 Wnt 신호경로는 소화기관 형성 과정에서 핵심적인 신호로 알려져 있으며 점막 상피세포의 성장과 분화에도 매우 중요하다[28]. 예를 들어 Wnt 신호경로를 파괴하면 소화관 상피세포를 생산하는 줄기세포가 급격하게 줄어들어 소화관의 기능 이상이 나타난다[3]. Wnt 신호전달은 세포 속 주요 매개 분자인 β -catenin을 통해 매개된다[1, 3, 28]. Wnt 자극이 없는 세포에서 β -catenin이 GSK3 β 에 의해 인산화된 후 ubiquitination/proteasome 경로를 통해서 분해된다[1, 3, 28]. 그러나 Wnt 자극이 나타나면 GSK3 β 의 활성이 억제되어 β -catenin의 인산화 및 분해 과정이 차단되고 핵 속으로 들어가 특정 유전자의 전사를 개시한

*Corresponding author

Tel : +82-31-539-1855, Fax : +82-31-539-1850

E-mail : hokim@daejin.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

다. 특히 상피세포 속에서 Wnt 신호경로는 성장과 분화에 관련된 주요 유전자들을 조절하는 것으로 알려져 있다[3, 28].

본 연구에서 연구자 등은 대장상피세포의 성장과 분화에 중요한 Wnt 신호경로가 *C. difficile* 독신A에 의해 영향을 받는 지 확인해보고자 하였다. 이를 위해 비암화-인간대장세포주인 (nontransformed human colonic epithelial cells) NCM460세포[18, 19, 21]와 생쥐의 회장에 독신A를 처치한 뒤 Wnt 신호변화를 추적하였다. 그 결과 독신A가 강하게 Wnt 신호경로를 차단함을 확인하였다. 이상의 결과는 독신A가 야기하는 극단적인 소화관 상피세포의 자살과정이 Wnt 신호경로 차단과 밀접하게 연관되어 있음을 보여준다.

재료 및 방법

시약

β -catenin 항체, phospho-GSK3 β (Thr-390) 항체 등은 cell signaling biotechnology 사(MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. β -actin 항체는 Santa Cruz 사(CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) dye, MG132 등은 Sigma Aldrich 사(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다.

C. difficile 독신A 분리

독신A는 *C. difficile* 세균(VPI10463, American Type Culture Collection, Rockville, MD)으로부터 분리 정제하여 사용하였다(REF). 분리한 독신A의 순도는 전기영동을 수행하여 307 kDa 크기의 단일 단백질이 검출되는지를 확인하여 최종 검증하였다[18, 19, 21].

세포배양

비암화-인간대장상피세포주인 NCM460는 ATCC 사(VA, USA)에서 분양 받았다. NCM460세포 배양을 위해 10% FBS (fetal bovine serum, Invitrogen, USA)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Gland Island, NY)을 포함하는 M3D 배지 (INCELL Corporation, San Antonio, TX)를 이용하였고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 유지하였다[18, 19, 21].

Immunoblot analysis

약물을 처치한 세포는 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40)를 넣고 초음파를 이용 파쇄하였다. 단백질 분리를 위해서 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 단백질들은 nitrocellulose membrane 으로 다시 transfer하고 5% skim milk 속에서 1차 항체를 12시간 반응하였다. 그 후 2차 항체를 상온에서 2시간 동안 추가 반응하고 LumiGlo reagent(New England Biolabs 사, MA,

USA)를 이용하여 발색을 유도한 다음 chemiluminescence image analyzer (Fusion FX; Vilber Lourmat, Germany)를 이용하여 시각화하였다[24].

독신을 이용한 생쥐 장염 모델

본 연구는 대전대학교 동물실험위원회(Animal Care and Use Committee of Daejin University)의 방침 및 범규에 따라 진행되었다(승인번호: 2013-03). 6주령 생쥐를 마취하고 복부를 절개하여 회장을 노출시킨 다음 수술실을 이용 회장 일부를 묶어 3 cm 회장주머니를 확립하였다. 인슐린 주사기를 이용 각 회장주머니에 독신A (3 nM)를 주입하고 4시간 동안 마취를 유지하여 급성 장염을 유발시켰다. Proteasome 의존 단백질 분해과정을 차단하기 위해 MG132를 독신A와 함께 주입하였다. 점막 상피세포 추출액은 슬라이드글라스를 이용 회장 점막을 긁어 모아서 확보하였다[18, 19, 21].

Statistical analysis

모든 실험은 3회 반복으로 실행하여 결과의 유의성을 검정하였다[18, 19, 21].

결과 및 고찰

인간 대장상피세포에서 *C. difficile* 독신A는 β -catenin 단백질 분해를 촉진시킴

많은 연구에서 *C. difficile* 독신A는 활성산소를 증가시키거나 세포골격계를 변형시켜 세포자살을 유도한다고 알려져 있다[10-13, 25]. 독신A는 세포자살 촉진 인자인 FasL (Fas ligand)를 증가시켜 세포자살을 유도하기도 한다[21]. p21 증가와 그로 인한 세포주기 차단이 독신A에 의한 세포자살의 주요 경로라고 보고되기도 하였다[18]. 하지만 독신A가 유발하는 세포자살 경로는 아직 명확하게 밝혀져 있지 못한 실정이다. 따라서 본 연구에서 연구자 등은 대장상피세포의 성장과 분화에 중요하다고 알려져 온 Wnt 신호경로[3]에 대한 독신A의 영향을 확인해 보고자 하였다. 이를 위해 비암화-인간대장상피세포(NCM460)에 독신A를 처치한 뒤 Wnt 신호경로의 핵심 단백질인 β -catenin 단백질의 양적 변화를 immunoblot analysis를 통해서 확인하였다. Fig. 1A에서처럼, 독신A는 대장상피세포 속 β -catenin 단백질을 유의하게 감소시켰다. 독신A 자극 후 β -catenin 단백질 감소는 1시간 이내에서 확인되었으며 3시간까지 그 감소가 유지되었다. 하지만 독신A 처치 6시간 이후부터 β -catenin의 단백질 양이 점차 회복되어 9시간 이후에는 기저 양으로 완전 회복됨을 확인하였다. 다음으로 독신A에 의한 β -catenin 감소가 단백질 분해과정 촉진으로 초래된 결과인지 확인해보았다. Wnt 신호경로의 핵심단백질인 β -catenin의 기능 조절이 proteasome을 통한 단백질 분해과정에 의존적이라고 알려져 있기 때문이다[2]. 이를 위해 NCM460 세포에

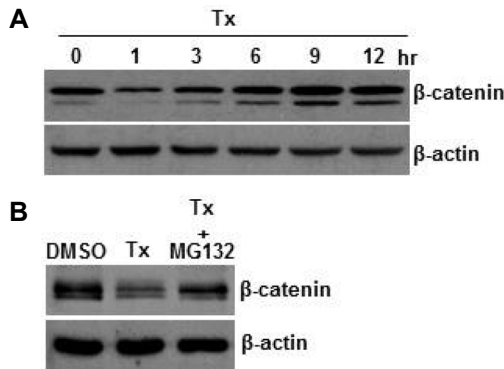


Fig. 1. *C. difficile* toxin A induces degradation of β -catenin protein in human colonocytes. A. NCM460 cells (nontransformed human colonocytes) were incubated with toxin A (3 nM) for the indicated times. Cell lysates were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis, and blots were probed with antibodies against β -catenin and b-actin. The presented results are representative of three independent experiments. B. NCM460 cells were incubated with DMSO (solvent control), toxin A (Tx, 3 nM), or toxin A plus MG132 (0.1 μ M in DMSO) for 3 hr. The level of β -catenin in colonic epithelial cells was measured by immunoblot analysis. The presented results are representative of three independent experiments.

독신A와 proteasome 억제제인 MG132를 [8] 처치한 후 β -catenin 변화를 확인하였다. Fig. 1B에서처럼, 독신A에 의한 β -catenin 감소가 MG132 처치에 의해 유의하게 회복됨을 확인하였다. 이는 독신A가 proteasome 경로를 통해 β -catenin 단백질의 분해 과정을 촉진시켰음을 보여준다.

C. *difficile* 독신A에 의한 GSK3 β 의 활성화

Wnt 자극이 없는 세포 속에서 기본적으로 활성화되어 있는 GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β)는 β -catenin을 지속적으로 인산화시켜 단백질 분해과정을 촉진시키며 이를 통해 β -catenin을 최소량으로 유지한다고 알려져 있다 [2, 3]. 이를 바탕으로 연구자 등은 β -catenin 단백질 양을 감소시키는 *C. difficile* 독신A 효과가 GSK3 β 의 활성 변화와 연관되어 있는지를 확인하였다. 이를 위해, 인간 대장상피세포에 독신A를 처치하고 GSK3 β 활성화형 인산화(Thr390) [4] 변화를 확인하였다. Fig. 2에서처럼, 독신A 처치는 GSK3 β 의 활성화형 인산화를 (Thr390) [4] 시간-의존적으로 증가시켰다. 이는 인간 대장상피세포에서 *C. difficile* 독신A가 GSK3 β 효소 활성 증대를 통해 β -catenin 단백질의 분해 과정을 촉진시켰음을 보여준다. GSK3 β 효소의 활성화에 영향을 미치는 주요 인자로 활성산소가 알려져 있다 [29]. 독신A 자극 후 나타나는 세포생물학적 독성이 표적세포 속에서 빠르게 생성되는 활성산소에 기인한다는 결과들을 고려해 볼 때, 독신A에 의한 활성산소 발생이 GSK3 β 효소 활성화에 주요하게 작용했을 가능성이 높다고

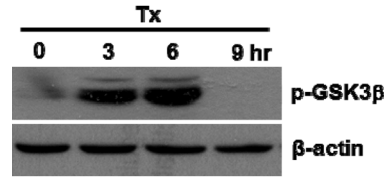


Fig. 2. *C. difficile* toxin A activates colonocyte GSK3 β promoting β -catenin degradation. NCM460 cells were incubated with toxin A (Tx, 3 nM) for the indicated times. Cell lysates were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis, and blots were probed with antibodies against phospho-GSK3 β (Thr390) and b-actin. The presented results are representative of three independent experiments.

추정된다.

독신A에 의한 β -catenin 감소현상은 다양한 생리학적 의미를 부여한다. 그 이유는 β -catenin 신호분자가 Wnt 신호의 중요 매개분자이기도 하지만 상피세포의 부착과정(세포-세포, 세포-기질)에서 핵심 조절자로 작용하기 때문이다 [22, 30]. 세포-기질 부착과정에서 β -catenin은 세포 속 미세섬유가 세포막 인테그린 단백질과 구조적으로 연결되는 부위에서 부착단백질로 작용한다 [22]. 또한 세포-세포 부착과정에는 E-카드헤린 단백질과 결합하여 세포의 구조적 안정성을 제공한다 [30]. 따라서 독신A가 야기하는 극단적인 세포원형화 (cell rounding)가 세포부착 변화(세포-세포 결합감소, 세포-기질 결합감소)에 기인될 수 있다는 가능성을 감안할 때, 독신A에 의한 β -catenin 단백질 감소 현상으로 설명이 가능할 수 있다. 지금까지 독신A에 의한 세포원형화는 주로 미세섬유와 미세소관 형성 저해로 설명되어 왔다 [10-13]. 독신A에 의한 미세섬유 형성 저해는 Rho, Rac, cdc42 활성감소에 기인한다고 알려져 있다 [11, 12]. 그리고 독신A에 의한 미세소관 형성 저해는 히스톤탈아세틸화효소-6(HDAC-6)의 활성 증가와 튜블린 단백질의 탈아세틸화로 기인한다고 보고되었다 [25]. 하지만 본 연구결과를 통해서 독신A에 의한 β -catenin 단백질 감소가 독신A가 야기하는 세포원형화의 하나의 주요 과정일 수 있음이 확인되었다. 독신A에 의한 세포원형화와 β -catenin 단백질 감소가 동일 시간에 나타나는 점을 감안하면, 두 과정이 서로 밀접하게 연관되어 있음을 시사한다.

C. *difficile* 독신A는 생쥐 회장 상피세포 속 Wnt 신호경로를 억제함

인간 대장상피세포에서 독신A가 GSK3 β 효소 활성 증대를 통해 β -catenin을 빠르게 분해시킨다는 사실을 바탕으로 (Fig. 1), 생쥐 소화관 상피세포에 대한 독신A의 영향을 재확인해보았다. 6주령 수컷 생쥐를 마취하고 수술실을 이용 회장주머니를 형성한 다음 독신A를 4시간 동안 주입하여 급성 장염을 유도하였다. 장염 유도 후 회장 점막 상피세포 속 β -catenin 단백질의 양변화를 immunoblot analysis를 통해 확인하였다.

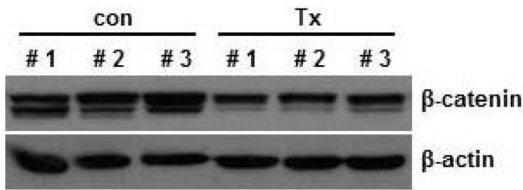


Fig. 3. *C. difficile* toxin A inhibits the Wnt signaling pathway in mouse gut epithelial cells. B6 mice were anesthetized, and ileal loops were prepared and injected with PBS (con), or toxin A (Tx, 3 nM). After 4 hr, epithelial cells were collected from the ileal loops by scraping with glass slides, and the level of β -catenin in ileal epithelial cells was measured by immunoblot analysis. The presented results are representative of three independent experiments (n=8 per group).

앞서 결과에서처럼(Fig. 1), 독신A 주입은 생쥐의 회장 상피세포 속 β -catenin 양을 현저하게 감소시켰다. 배양중인 인간 대장상피세포주뿐만 아니라 생쥐 회장 점막 상피세포와도 동일하게 독신A가 Wnt 신호를 차단할 수 있음이 확인되었다.

생쥐 회장 상피세포에서 독신A에 의한 β -catenin 분해과정이 MG132 처치로 억제됨

독신A가 생쥐 회장 점막상피세포 속 β -catenin 단백질 양을 감소시킨다는 결과를 바탕으로 연구자들은 MG132에 의한 proteasome 억제가 독신A 자극으로 감소하는 β -catenin을 회복시키는지 확인해 보고자 하였다. 이를 위해 생쥐의 회장주머니에 독신A와 MG132를 함께 주입하고 4시간 후 β -catenin 변화를 평가하였다. Fig. 4에서처럼, MG132 처치는 독신A에 의한 β -catenin 단백질 감소를 유의하게 회복시켰다. 이 결과는 인간대장상피세포의 결과에서처럼, 독신A가 생쥐의 회장 점막상피세포에서도 동일한 경로를 통해 Wnt 신호경로를 차단함을 보여준다. 즉, 생쥐 회장 점막 상피세포에서도 독신A에 의한 GSK3 β 활성화가 β -catenin 단백질 분해과정 촉진을

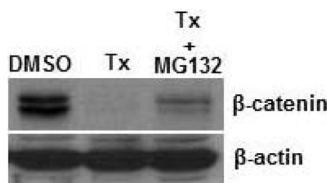


Fig. 4. MG132 restores β -catenin protein production in mouse gut epithelial cells reduced by treatment with toxin A. Ileal loops were prepared and injected with DMSO (solvent control), toxin A (Tx, 3 nM), or toxin A plus MG132 (0.1 μ M) for 4 hr. Epithelial cell extracts of the ileal loops were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis, and the blots was probed with antibodies against β -catenin and b-actin. The presented results are representative of three independent experiments (n=8 per group).

유도했음을 시사한다.

Wnt 신호경로가 소화관 상피세포의 성장과 분화 그리고 세포자살 조절에 있어서 중요 인자라는 점을 감안해 볼 때[2, 3], 독신A에 의한 Wnt 신호경로 억제가 독신A가 야기하는 장 상피세포 자살과정과 밀접하게 연관되어 있음을 추정할 수 있다. 실제로 Wnt 신호가 억제될 경우, 점막 상피세포 성장이 억제됨은 물론 점막 구조 파괴와 장염이 야기된다고 알려져 있다[7]. 반대로, 소장 상피세포에 대해서 Wnt 신호경로를 활성화시키면 세균 감염-유발 장내 염증반응이 유의하게 낮아진다고 알려져 있다[23]. 또한 MG132 처치가 IL-10 결핍 생쥐에서 발생하는 장염을 유의하게 개선시킨다는 보고도 있다[8].

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01325602)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Brunt, L. H., Begg, K., Kague, E., Cross, S. and Hammond, C. L. 2017. Wnt signalling controls the response to mechanical loading during zebrafish joint development. *Development* **144**, 2798-2809.
2. Clevers, H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-480.
3. Fevr, T., Robine, S., Louvard, D. and Huelsken, J. 2007. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7551-7559.
4. Han, G., Casson, R. J., Chidlow, G. and Wood, J. P. 2014. The mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces endoplasmic reticulum stress and activation of GSK-3beta in cultured rat retinal cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 5616-5628.
5. He, D., Hagen, S. J., Pothoulakis, C., Chen, M., Medina, N. D., Warny, M. and LaMont, J. T. 2000. *Clostridium difficile* toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells. *Gastroenterology* **119**, 139-150.
6. He, D., Sougioultzis, S., Hagen, S., Liu, J., Keates, S., Keates, A. C., Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2002. *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology* **122**, 1048-1057.
7. Hoffman, J., Kuhnert, F., Davis, C. R. and Kuo, C. J. 2004. Wnts as essential growth factors for the adult small intestine and colon. *Cell Cycle* **3**, 554-557.
8. Inoue, S., Nakase, H., Matsuura, M., Mikami, S., Ueno, S., Uza, N. and Chiba, T. 2009. The effect of proteasome inhibitor MG132 on experimental inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* **156**, 172-182.
9. Jeffers, M., McDonald, W. F., Chillakuru, R. A., Yang, M., Nakase, H., Deegler, L. L., Sylander, E. D., Rittman, B.,

- Bendele, A., Sartor, R. B. and Lichenstein, H. S. 2002. A novel human fibroblast growth factor treats experimental intestinal inflammation. *Gastroenterology* **123**, 1151-1162.
10. Just, I., Fritz, G., Aktories, K., Giry, M., Popoff, M. R., Boquet, P., Hegenbarth, S. and von Eichel-Streiber, C. 1994. *Clostridium difficile* toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J. Biol. Chem.* **269**, 10706-10712.
 11. Just, I., Selzer, J., von Eichel-Streiber, C. and Aktories, K. 1995. The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. *J. Clin. Invest.* **95**, 1026-1031.
 12. Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. and Aktories, K. 1995. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**, 500-503.
 13. Just, I., Wilm, M., Selzer, J., Rex, G., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. and Aktories, K. 1995. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 13932-13936.
 14. Kanazawa, S., Tsunoda, T., Onuma, E., Majjima, T., Kagiya, M. and Kikuchi, K. 2001. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 822-828.
 15. Kelly, C. P. and LaMont, J. T. 1998. *Clostridium difficile* infection. *Annu. Rev. Med.* **49**, 375-390.
 16. Kelly, C. P., Pothoulakis, C. and LaMont, J. T. 1994. *Clostridium difficile* colitis. *N. Engl. J. Med.* **330**, 257-262.
 17. Kim, D. H., Hwang, J. S., Lee, I. H., Nam, S. T., Hong, J., Zhang, P., Lu, L. F., Lee, J., Seok, H., Pothoulakis, C., Lamont, J. T. and Kim, H. 2016. The insect peptide CopA3 increases colonic epithelial cell proliferation and mucosal barrier function to prevent inflammatory responses in the gut. *J. Biol. Chem.* **291**, 3209-3223.
 18. Kim, H., Kokkotou, E., Na, X., Rhee, S. H., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2005. *Clostridium difficile* toxin A-induced colonocyte apoptosis involves p53-dependent p21(WAF1/CIP1) induction via p38 mitogen-activated protein kinase. *Gastroenterology* **129**, 1875-1888.
 19. Kim, H., Rhee, S. H., Kokkotou, E., Na, X., Savidge, T., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and LaMont, J. T. 2005. *Clostridium difficile* toxin A regulates inducible cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis in colonocytes via reactive oxygen species and activation of p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* **280**, 21237-21245.
 20. Kim, H., Rhee, S. H., Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2009. *Clostridium difficile* toxin A binds colonocyte Src causing dephosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin. *Exp. Cell. Res.* **315**, 3336-3344.
 21. Kim, H., Rhee, S. H., Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2007. Inflammation and apoptosis in *Clostridium difficile* enteritis is mediated by PGE2 up-regulation of Fas ligand. *Gastroenterology* **133**, 875-886.
 22. Kim, Y., Kugler, M. C., Wei, Y., Kim, K. K., Li, X., Brumwell, A. N. and Chapman, H. A. 2009. Integrin alpha3beta1-dependent beta-catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. *J. Cell. Biol.* **184**, 309-322.
 23. Liu, X., Wu, S., Xia, Y., Li, X. E., Zhou, Z. D. and Sun, J. 2011. Wingless homolog Wnt11 suppresses bacterial invasion and inflammation in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **301**, G992-G1003.
 24. Na, X., Zhao, D., Koon, H. W., Kim, H., Husmark, J., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and LaMont, J. T. 2005. *Clostridium difficile* toxin B activates the EGF receptor and the ERK/MAP kinase pathway in human colonocytes. *Gastroenterology* **128**, 1002-1011.
 25. Nam, H. J., Kang, J. K., Kim, S. K., Ahn, K. J., Seok, H., Park, S. J., Chang, J. S., Pothoulakis, C., Lamont, J. T. and Kim, H. 2010. *Clostridium difficile* toxin A decreases acetylation of tubulin, leading to microtubule depolymerization through activation of histone deacetylase 6, and this mediates acute inflammation. *J. Biol. Chem.* **285**, 32888-32896.
 26. Resar, L., Chia, L. and Xian, L. 2018. Lessons from the Crypt: HMGA1-Amping up Wnt for Stem Cells and Tumor Progression. *Cancer Res.* **78**, 1890-1897.
 27. Riegler, M., Sedivy, R., Sogukoglu, T., Castagliuolo, I., Pothoulakis, C., Cosentini, E., Bischof, G., Hamilton, G., Teleky, B., Feil, W., Lamont, J. T. and Wenzl, E. 1997. Epidermal growth factor attenuates *Clostridium difficile* toxin A- and B-induced damage of human colonic mucosa. *Am. J. Physiol.* **273**, G1014-G1022.
 28. Uchiyama, K., Sakiyama, T., Hasebe, T., Musch, M. W., Miyoshi, H., Nakagawa, Y., He, T. C., Lichtenstein, L., Naito, Y., Itoh, Y., Yoshikawa, T., Jabri, B., Stappenbeck, T. and Chang, E. B. 2016. Butyrate and bioactive proteolytic form of Wnt-5a regulate colonic epithelial proliferation and spatial development. *Sci. Rep.* **6**, 32094.
 29. Wang, C. Y., Yang, T. T., Chen, C. L., Lin, W. C. and Lin, C. F. 2014. Reactive oxygen species-regulated glycogen synthase kinase-3beta activation contributes to all-trans retinoic acid-induced apoptosis in granulocyte-differentiated HL60 cells. *Biochem. Pharmacol.* **88**, 86-94.
 30. Zhang, X., Yang, M., Shi, H., Hu, J., Wang, Y., Sun, Z. and Xu, S. 2017. Reduced E-cadherin facilitates renal cell carcinoma progression by WNT/beta-catenin signaling activation. *Oncotarget* **8**, 19566-19576.

초록 : 대장상피세포 속 Wnt 신호 경로에 대한 C. difficile 독신A의 영향

윤이나 · 김 호*

(대전대학교 과학기술대학 생명화학부 생명과학전공)

C. difficile 독신A에 의한 대장상피세포 자살과정은 위막성대장염(Pseudomembranous colitis)의 주요 원인으로 고려되고 있다. 독신A는 활성산소를 증가시켜 세포자살 신호를 유도한다. 또한 독신A는 미세섬유나 미세소관과 같은 세포골격계 형성을 저해함으로써 자살을 유도한다고 알려져 있다. 하지만 독신A가 야기하는 소화기 상피세포 자살경로는 아직 불분명하다. 본 연구에서는 소화관 상피세포의 성장과 분화 그리고 기능에 중요하다고 알려져 온 Wnt 신호경로에 대한 독신A의 영향을 확인해보았다. 이를 위해 비암화-인간대장세포주(NCM460)에 독신A를 처리하고 Wnt 신호 분자들의 변화를 추적하였다. 또한 독신A를 주입한 생쥐의 회장 상피세포 속 Wnt 신호경로 변화도 평가하였다. 인간 대장상피세포에서 독신A는 Wnt 경로의 핵심 신호분자인 β -catenin 단백질의 양을 빠르게 감소시켰다. 이 현상은 생쥐 회장 상피세포에서도 동일하게 확인되었다. 연구자들은 독신A가 GSK3 β 활성형 인산화(Thr390)를 증가시키기도 확인하였다. 이는 독신A가 GSK3 β 의 활성을 높여서 β -catenin의 인산화시키고 이를 통해 단백질 분해 과정이 촉진되었음을 보여준다. 이 결과들을 종합하면, 독신A에 의한 소화관 상피세포 자살과정이 상피세포의 성장과 자살을 조절하는 Wnt 신호경로 차단과 밀접하게 연관되어 있음을 보여준다.